

**KARAKTERISASI BAKTERIOSIN YANG DIHASILKAN
OLEH *Lactobacillus pentosus* K 50 SEBAGAI AGEN
BIOPRESERVATIF PANGAN**

SKRIPSI

**oleh
NOFA PURWANINGSIH
145090101111003**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**KARAKTERISASI BAKTERIOSIN YANG DIHASILKAN
OLEH *Lactobacillus pentosus* K 50 SEBAGAI AGEN
BIOPRESERVATIF PANGAN**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

**oleh
NOFA PURWANINGSIH
145090101111003**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI**KARAKTERISASI BAKTERIOSIN YANG DIHASILKAN
OLEH *Lactobacillus pentosus* K 50 SEBAGAI AGEN
BIOPRESERVATIF PANGAN****NOFA PURWANINGSIH
145090101111003**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 16 Oktober 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing,

Yoga Dwi Jatmiko, S.Si., M.App.Sc., Ph.D
NIP. 19810102005011002

Mengetahui
Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodliyati Azrianingsih, S.Si., MAg. Sc., Ph.D
NIP. 197001281994122001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Nofa Purwaningsih
NIM : 145090101111003
Jurusan : Biologi
Penulis skripsi berjudul : Karakterisasi Bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* K 50 sebagai Agen Biopreservatif Pangan

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya yang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 16 Oktober 2018
Yang menyatakan

Nofa Purwaningsih
145090101111003

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



Karakterisasi Bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* K 50 sebagai Agen Biopreservatif Pangan

Nofa Purwaningsih, Yoga Dwi Jatmiko
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya
2018

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan optimum *bacteriocin-like inhibitory substances* (BLIS) yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* K 50 dan mengonfirmasi BLIS tersebut memiliki karakteristik sebagai bakteriosin serta mengetahui ketahanan bakteriosin pada berbagai faktor fisikokimia seperti pH, suhu, pelarut organik, dan surfaktan. Penentuan fase pertumbuhan dan aktivitas penghambatan optimum terhadap *Escherichia coli* 1423-SL dilakukan menggunakan metode *agar disc-diffusion*. Karakterisasi protein BLIS dikonfirmasi menggunakan enzim proteinase-K. Ketahanan bakteriosin pada berbagai faktor fisikokimia diuji melalui aktivitas penghambatannya menggunakan teknik pengenceran bertingkat. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga kali ulangan. Data dianalisis menggunakan *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan tingkat signifikansi $\alpha=0,05$. Aktivitas penghambatan optimum BLIS terhadap *E. coli* 1423-SL terjadi pada jam ke-24 dengan densitas sel *L. pentosus* K 50 sebanyak 7,06 log sel/mL dan aktivitas antimikrobanya sebesar 208,72 AU/mL. Senyawa BLIS yang dihasilkan oleh *L. pentosus* K 50 memiliki karakter sebagai bakteriosin ditandai dengan terjadinya inaktivasi setelah penambahan proteinase-K. Konsentrasi protein juga meningkat setelah dilakukan pemurnian secara parsial yang berkorelasi dengan peningkatan aktivitas antimikroba. Aktivitas antimikroba bakteriosin tetap stabil pada kisaran pH 3-7, suhu ruang hingga 100°C, surfaktan berupa EDTA, Tween 20 dan Tween 80, serta pada pelarut organik berupa metanol, etanol dan aseton.

Kata kunci: antimikroba, bakteriosin, BLIS, *Lactobacillus pentosus*

Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus pentosus* K 50 as Food Biopreservative Agent

Nofa Purwaningsih, Yoga Dwi Jatmiko
Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural
Sciences, Universitas Brawijaya
2018

ABSTRACT

This study aimed to determine the optimum inhibitory activity of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Lactobacillus pentosus* K 50 and to confirm that BLIS has characteristics as bacteriocin as well as to evaluate the bacteriocin resistance in various physicochemical factors such as pH, temperature, organic solvents, and surfactants. The determination of the optimum growth phase and BLIS production through an inhibition test against *Escherichia coli* 1423-SL using agar disc-diffusion assay. The characterization of BLIS protein was confirmed using proteinase-K enzyme. Bacteriocin resistance to various physicochemical factors was tested through its inhibitory activity using serial dilution technique. This study used a completely randomized design with three replicates. Data were analyzed using One-Way Analysis of Variance (ANOVA) with a significance level of $\alpha = 0.05$. The optimum inhibitory activity of BLIS against *E. coli* 1423-SL occurred at 24th hours with cell density of *L. pentosus* K 50 by 7.06 log cells/mL and its antimicrobial activity was 208.72 AU/mL. BLIS produced by *L. pentosus* K 50 has been confirmed as bacteriocin as shown by the occurrence of inactivation after addition of proteinase-K. The protein concentration also increased after partial purification which correlated with the increase of its antimicrobial activity. The antimicrobial activity of bacteriocin remained stable in the range of pH 3-7, room temperature until 100°C, surfactants (EDTA, Tween 20 and Tween 80), as well as in organic solvents (methanol, ethanol and acetone).

Keywords: antimicrobial, bacteriocin, BLIS, *Lactobacillus pentosus*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil ‘Aalamiin, dengan ungkapan rasa syukur pada Allah Yang Maha Kuasa akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang. Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Bapak Yoga Dwi Jatmiko. S.Si., M.App.Sc., Ph.D selaku Dosen Pembimbing yang telah mendampingi dan memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
2. Ibu Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D dan Bapak Irfan Mustafa, S.Si.,M.Si.,Ph.D selaku Dosen Penguji yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan skripsi.
3. Bapak Dr. Suharjono, MS selaku Kepala Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya atas segala saran dan masukannya.
4. Ibu Dra. Nanik Dwi Rahayu selaku Laboran di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UB.
5. Orang tua, kakak, adik, keluarga dan Vikky Agustyono atas segala doa, dukungan, dan motivasinya.
6. Laksmita Tristy O, Intan Kartikasari, Zhafirah Fauziyyah, Kurrotul Uyun, Siti Rodiyah, Violita Y.E, Hellena Daten, Ni Made Dwiriani, Geraldo Johan F, Lita N. U, Sony Harnanta P, Kinanti Nu. P, Vania Andona, Arnoldus, Rekan-rekan S2 dan S3 Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UB serta Rekan-rekan Biologi Angkatan 2014 “AMINO” dan seluruh civitas akademika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penulisan skripsi ini merupakan upaya optimal penulis sebagai sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, 16 Oktober 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN.....	xii
 BAB I PENDAHULUAN.....	 1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	 4
2.1 Karakteristik Bakteriosin.....	4
2.2 Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin...	4
2.3 Biosintesis Bakteriosin.....	5
2.4 Klasifikasi Bakteriosin.....	7
2.5 Mekanisme Penghambatan oleh Bakteriosin..	8
2.6 Faktor-Faktor yang Memengaruhi Aktivitas Bakteriosin.....	9
 BAB III METODE PENELITIAN.....	 11
3.1 Waktu dan Tempat.....	11
3.2 Persiapan Isolat.....	11
3.3 Fase-fase Pertumbuhan <i>Lactobacillus</i> <i>pentosus</i> K 50.....	11
3.3.1 Produksi <i>Bacteriocin-Like Inhibitory</i> <i>Substances</i> (BLIS).....	12
3.3.2 Uji Aktivitas Antimikroba <i>Bacteriocin-</i> <i>Like Inhibitory Substances</i> (BLIS) terhadap <i>Escherichia coli</i> 1423-SL.....	12
3.3.2.1 Metode <i>agar disc-diffusion</i>	12
3.3.2.2 Metode pengenceran bertingkat.	13

3.4 Uji Konfirmasi BLIS.....	13
3.5 Penentuan Profil Protein.....	13
3.5.1 Penentuan konsentrasi protein (metode Bradford).....	14
3.5.2 Konfirmasi berat molekul bakteriosin dengan SDS-PAGE.....	14
3.6 Uji Ketahanan Bakteriosin terhadap Faktor Fisikokimia.....	15
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	17
4.1 Aktivitas Antimikroba <i>Lactobacillus</i> <i>pentosus</i> K 50.....	18
4.2 Konfirmasi BLIS.....	18
4.3 Pemurnian Protein secara Parsial.....	19
4.4 Karakterisasi Bakteriosin yang Dihasilkan oleh <i>Lactobacillus pentosus</i> K 50.....	22
4.4.1 Ketahanan bakteriosin terhadap variasi pH.....	22
4.4.2 Ketahanan bakteriosin terhadap beberapa variasi suhu.....	23
4.4.3 Ketahanan bakteriosin terhadap beberapa variasi surfaktan dan pelarut organik.....	25
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	27
5.1 Kesimpulan.....	27
5.2 Saran.....	27
DAFTAR PUSTAKA.....	28
LAMPIRAN.....	34

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Skema biosintesis bakteriosin.....	6
2	Kurva pertumbuhan dan aktivitas antimikroba BLIS dari <i>Lactobacillus pentosus</i> K 50.....	18
3	Ketahanan hidup (<i>survival rate</i>) <i>E. coli</i> 1423-SL terhadap aktivitas antimikroba BLIS yang dihasilkan <i>L. pentosus</i> K 50 sebelum dan setelah penambahan Proteinase-K.....	19
4	Ketahanan hidup (<i>survival rate</i>) <i>E. coli</i> 1423-SL terhadap aktivitas bakteriosin yang dihasilkan <i>L. pentosus</i> K 50 dan konsentrasi protein pada setiap tahapan purifikasi parsial	21
5	Hasil elektroforesis SDS-PAGE.....	22
6	Ketahanan hidup (<i>survival rate</i>) <i>E. coli</i> 1423-SL terhadap aktivitas antimikroba bakteriosin yang dihasilkan <i>L. pentosus</i> K 50 pada variasi pH.....	23
7	Ketahanan hidup (<i>survival rate</i>) <i>E. coli</i> 1423-SL terhadap aktivitas antimikroba bakteriosin yang dihasilkan <i>L. pentosus</i> K 50 pada variasi suhu.....	24
8	Ketahanan hidup (<i>survival rate</i>) <i>E. coli</i> 1423-SL terhadap aktivitas antimikroba bakteriosin yang dihasilkan <i>L. pentosus</i> K 50 pada beberapa jenis surfaktan dan pelarut organik.....	26

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Kurva standar	34
2	Uji aktivitas BLIS dengan metode <i>agar disc-diffusion</i>	35
3	Uji aktivitas BLIS terhadap <i>E.coli</i> 1423-SL berdasarkan lama waktu inkubasi	35
4	Analisis data ketahanan hidup (<i>survival rate</i>) <i>E. coli</i> 1423-SL terhadap aktivitas antimikroba bakteriosin yang dihasilkan <i>L. pentosus</i> K 50 pada variasi pH	37
5	Analisis data ketahanan hidup (<i>survival rate</i>) <i>E. coli</i> 1423-SL terhadap aktivitas antimikroba bakteriosin yang dihasilkan <i>L. pentosus</i> K 50 pada variasi suhu.....	38
6	Analisis data ketahanan hidup (<i>survival rate</i>) <i>E. coli</i> 1423-SL terhadap aktivitas antimikroba bakteriosin yang dihasilkan <i>L. pentosus</i> K 50 pada variasi surfaktan	39
7	Analisis data ketahanan hidup (<i>survival rate</i>) <i>E. coli</i> 1423-SL terhadap aktivitas antimikroba bakteriosin yang dihasilkan <i>L. pentosus</i> K 50 pada variasi pelarut organik	40
8	Analisis data konsentrasi protein.....	41
9	Analisis data uji antimikroba pada hasil setiap tahap purifikasi parsial.....	43

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
A(A260)	absorbansi (absorbansi pada 260 nm)
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	<i>ammonium phosphate</i>
ATP	<i>adenosine triphosphat</i>
BAL	bakteri asam laktat
BLIS	<i>bacteriocin-like inhibitory substance</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CFS	<i>cell free supernatant</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
HCl	<i>hydrogen chloride</i>
HPK	<i>histidine protein kinase</i>
IF	<i>induction factor</i>
IgA	<i>Imunoglobulin A</i>
MRS	<i>De Man, Rogosa and Sharpe</i>
NaOH	natrium hidroksida
OD	<i>optical density</i>
pH	<i>power of hydrogen</i>
PMF	<i>proton motive force</i>
RAL	rancangan acak lengkap
rDNA	<i>ribosomal deoxyribonucleic acid</i>
RR	<i>regulator respon</i>
RSB	<i>reducing sample buffer</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
TEMED	<i>tetramethyl ethylene diamine</i>
Tris	<i>tris (hydroxymethyl) aminomethane</i>

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Nama unit</u>
α	alfa
μL	mikroliter
μm	mikrometer
AU/mL	<i>arbitrary unit per mililiter</i>
cfu/mL	<i>colony forming unit per mililiter</i>
Da	dalton

g	gram
kDA	kilodalton
M	molar
mA	miliampere
mg/mL	miligram per mililiter
mL	mililiter
°C	celcius
ppm	<i>part per milion</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kesadaran masyarakat terhadap keamanan pangan meningkat seiring dengan adanya banyak penyalahgunaan bahan pengawet yang tidak diizinkan dalam bahan pangan (Meutia, 2011), sehingga diperlukan alternatif bahan pengawet makanan yang alami. Penggunaan bahan pengawet ini bertujuan untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme kontaminan yang bersifat patogen maupun penyebab kebusukan pada bahan makanan. Pengendalian mikroba patogen dan pembusuk pada bahan makanan sangat penting dilakukan untuk menjaga kualitas dan keamanan makanan (Senbagam dkk., 2013).

Mikroorganisme patogen dan pembusuk makanan dapat dihambat pertumbuhannya oleh senyawa antimikrobia yang salah satunya dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL). Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang tergolong *generally recognized as safe* sehingga aman bagi kesehatan manusia. Kelompok bakteri ini memiliki potensi sebagai probiotik yang dapat menghasilkan senyawa antimikrobia, antara lain asam organik (asam laktat, asetat, propinat dan format), diasetil dan bakteriosin (Navaro dkk., 2000).

Bakteriosin merupakan peptida antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri yang dapat membunuh maupun menghambat pertumbuhan bakteri lain. Jika peptida antimikroba (bakteriosin) tersebut urutan asam amino dan sifat biokimianya belum sepenuhnya dikarakterisasi maka senyawa antimikroba ini disebut sebagai *bacteriocin-like inhibitory substances* (BLIS) (Settanni & Corsetti, 2008). BLIS juga bertindak sebagai zat antagonis, dengan potensi bakterisidal atau bakteriostatik terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif, serta tidak berbahaya bagi spesies penghasilnya. Sedangkan, bakteriosin yang disintesis oleh ribosom terdiri atas kurang lebih 30-60 asam amino memiliki variasi dalam hal aktivitas, berat molekul, sifat biokimia dan asal genetik (Cleveland dkk., 2001). Salah satu jenis bakteriosin yang telah diproduksi dan dipasarkan adalah nisin. Bakteriosin jenis ini dihasilkan oleh *Lactococcus lactis* (Avaiyarasi dkk., 2016). Jenis bakteriosin lain yang telah dikenal meliputi diplococcin, acidophilin, bulgaricin, helveticin, lactacin dan

plantaricin (Aly dkk., 2006). Beberapa tahun terakhir, BAL terutama spesies *Lactobacillus* telah banyak diteliti kemampuannya dalam menghasilkan bakteriosin.

Bakteriosin diketahui memiliki aktivitas bakterisidal terhadap spesies yang berkerabat dekat secara filogeni dengan spesies penghasilnya (Riley & Chava, 2007). Bakteriosin juga sering disebut sebagai peptida antimikroba yang disintesis di ribosom. Peptida ini menunjukkan tingkat spesifisitas target yang tinggi terhadap strain bakteri yang berhubungan erat dengannya dan menunjukkan aktivitas antimikroba pada konsentrasi serendah picomolar hingga nanomolar. Bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL diketahui tidak beracun dan dapat terdegradasi oleh enzim protease, sehingga tidak memiliki atau sedikit berpengaruh pada mikrobiota usus (Woraprayote, 2016).

Kriteria bakteriosin yaitu berupa protein, bersifat bakterisidal, memiliki sifat pengikatan spesifik terhadap bakteri target (*specific binding site*), gen pengkode bakteriosin terdapat di dalam plasmid, aktif terhadap bakteri yang dekat secara filogeni dan tidak membunuh bakteri penghasilnya (Ogunbawo, 2003). Secara umum, aktivitas bakteriosin dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu pH, suhu, enzim, dan pelarut organik (Senbagam dkk., 2013) serta surfaktan (Sunaryanto & Tarwadi, 2015). Ketahanan bakteriosin terhadap paparan fisikokimia tersebut yang terlibat selama proses pengolahan dan penyimpanan bahan pangan akan menjadi kriteria penting jika bakteriosin digunakan sebagai biopreservatif.

Produk fermentasi dari susu kuda dilaporkan mengandung BAL yang diduga menghasilkan bakteriosin, salah satunya yaitu *Lactobacillus pentosus* K 50. Hal ini ditunjukkan dengan adanya aktivitas *cell free supernatant* (CFS) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* 1423-SL dengan luas zona hambat sebesar 73,25 mm² (Karim, 2016). Penelitian yang lain menunjukkan bahwa *L. pentosus* 39, penghasil bakteriosin putatif, berpotensi sebagai antimikroba alami terhadap patogen psikrotrofik, seperti *Aeromonas hydrophila* dan *Listeria monocytogenes*. Teknologi biopreservasi ini akan memberikan efek antimikroba yang efektif selama waktu penyimpanan makanan apabila diterapkan dalam skala besar (Anacarso dkk., 2013). Berdasarkan beberapa kemampuan *L. pentosus* yang telah dilaporkan tersebut, maka *bacteriocin-like inhibitory substances* (BLIS) dari *L. pentosus* K 50 ini diperkirakan

juga memiliki potensi sebagai kandidat pengawet bahan pangan. Selain itu, proses pengolahan makanan melibatkan beberapa faktor yang dapat memengaruhi aktivitas bakteriosin, sehingga penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui karakter BLIS yang dihasilkan oleh *L. pentosus* K 50 pada berbagai faktor fisikokimia seperti pH, suhu, pelarut organik, dan surfaktan.

1.2 Rumusan Masalah

Masalah yang melatarbelakangi dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Bagaimana aktivitas penghambatan optimum BLIS yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* K 50 terhadap *Escherichia coli* 1423-SL?
2. Apakah BLIS yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* K 50 memiliki karakter sebagai bakteriosin?
3. Bagaimana ketahanan BLIS yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* K 50 pada berbagai faktor fisikokimia seperti pH, suhu, pelarut organik, dan surfaktan?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk:

1. Menentukan aktivitas penghambatan optimum BLIS yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* K 50 terhadap *Escherichia coli* 1423-SL.
2. Mengonfirmasi BLIS yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* K 50 memiliki karakter sebagai bakteriosin.
3. Menentukan ketahanan BLIS yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* K 50 pada berbagai faktor fisikokimia seperti pH, suhu, pelarut organik, dan surfaktan.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu memberikan wawasan mengenai potensi dan karakter bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* K 50 dalam menghambat pertumbuhan bakteri kontaminan maupun patogen pada makanan. Sehingga, bakteriosin tersebut dapat dijadikan sebagai alternatif bahan pengawet makanan alami yang aman bagi konsumen.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik Bakteriosin

Bakteriosin adalah senyawa protein yang berasal dari bakteri dan menunjukkan aktivitas bakterisidal terhadap spesies yang berhubungan dekat secara filogeni dengan spesies penghasil bakteriosin dan atau bakteri lain. Bakteriosin kerap dihasilkan oleh bakteri asam laktat dan ditemukan di hampir setiap spesies bakteri (Riley & Chavan, 2007). Bakteriosin dihasilkan oleh bakteri asam laktat secara alamiah tanpa menghambat pertumbuhan penghasilnya (Leroy & de Vuyst, 2004).

Kriteria bakteriosin yaitu berupa protein, bersifat bakterisidal, bakteri target memiliki sifat pengikatan spesifik (*specific binding site*), gen pengkode bakteriosin terdapat di dalam plasmid dan aktif terhadap bakteri yang dekat secara filogeni. Bakteriosin yang dihasilkan oleh beberapa galur BAL diketahui mempunyai aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen makanan sehingga dapat meningkatkan keamanan dan daya simpan pangan. Bakteriosin biasanya tahan terhadap panas misalnya pada suhu 100°C atau 121°C selama 15 menit, demikian pula suhu yang sangat rendah dan aktivitasnya masih tetap ada dalam lingkungan asam (Ogunbawo, 2003).

Bacteriosin-like inhibitory substances (BLIS) merupakan sebutan lain dari bakteriosin yang urutan asam amino dan sifat biokimianya belum sepenuhnya dikarakterisasi (Settanni & Corsetti, 2008). Sedangkan, bakteriosin membentuk kelompok peptida heterogen yang disintesis di ribosom. Peptida ini terdiri atas 30-60 asam amino dengan aktivitas, berat molekul, sifat biokimia dan asal genetik yang bervariasi (Cleveland dkk., 2001).

2.2 Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin

Bakteri penghasil bakteriosin sebagai biopreservatif diketahui banyak berasal dari kelompok BAL (Woraprayote dkk., 2016). Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri Gram positif, toleran terhadap asam, non-sporulasi, dan menghasilkan asam laktat sebagai metabolit primer (Salminen dkk., 1998). Ciri umum dari bakteri BAL yaitu dapat memfermentasi karbohidrat berupa glukosa menjadi asam

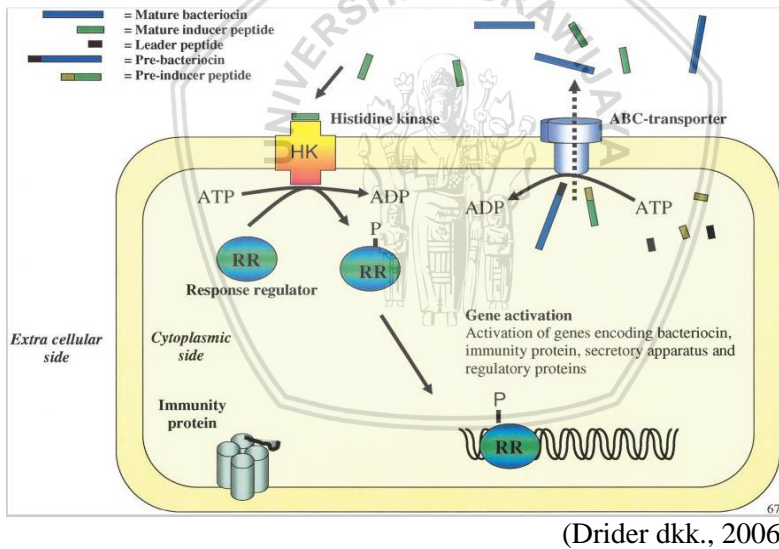
laktat, berbentuk kokus maupun batang, tumbuh optimum pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$, bersifat anaerob fakultatif, katalase negatif, oksidase positif dan pada umumnya bersifat motil. Sebagian besar BAL memiliki toleransi terhadap kondisi asam dan garam empedu (Yousef & Clastrom, 2003). Bakteri asam laktat mampu menghasilkan beberapa jenis metabolit seperti asam laktat, asam asetat, asam propinat, diasetil dan bakteriosin (Budde dkk., 2003). Metabolit bakteriosin yang diproduksi sangat bermanfaat bagi industri makanan fermentasi, karena aktivitas metabolit ini diketahui dapat menghambat pertumbuhan bakteri penyebab pembusukan maupun penyebab penyakit melalui makanan. Selain itu, penambahan senyawa bakteriosin dapat memperpanjang waktu penyimpanan makanan dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Neetles & Barefoot, 1993).

Lactobacillus pentosus merupakan spesies bakteri asam laktat yang sering ditemukan pada produk susu, daging dan sayuran (Guerreiro dkk., 2014). Lingkup ekologi *Lactobacillus pentosus* sama dengan *Lactobacillus plantarum* (Stiles & Holzapfel, 1997). Isolat *L. pentosus* K 50 yang diisolasi dari susu kuda Sumbawa telah diketahui dapat menghasilkan metabolit berupa asam laktat, asam organik, etanol dan bakteriosin. Adapun hasil aktivitas CFS netral yang berupa zona hambat diduga berasal dari aktivitas bakteriosin. Isolat ini diketahui dapat menghambat aktivitas bakteri *E. coli* 1423-SL dengan luas zona hambat $73,25\text{ mm}^2$ (Karim, 2016). Pada penelitian yang lain, *L. pentosus* 39 mampu menghasilkan bakteriosin putatif yang berpotensi sebagai agen antimikroba alami terhadap patogen psikrotrofik, seperti *Aeromonas hydrophila* dan *Listeria monocytogenes* pada fillet salmon segar. Teknologi biopreservasi ini, apabila digunakan dalam skala besar, maka akan memberikan efek antimikroba yang lebih baik selama penyimpanan makanan (Anacarso dkk., 2013). Beberapa strain *L. pentosus* telah dilaporkan memiliki potensi sebagai probiotik seperti percepatan sekresi IgA dalam air liur dan peningkatan produksi IgA di usus halus (Kotani dkk., 2010; Izumo dkk., 2011).

2.3 Biosintesis Bakteriosin

Proses biosintesis bakteriosin dipengaruhi oleh pH, suhu, konsentrasi etanol dan kondisi pertumbuhan bakteri yang

bersangkutan (Cotter dkk., 2005; Rojo-Bezares dkk., 2007). Proses biosintesis tersebut terjadi melalui ribosom selama fase eksponensial pada pertumbuhan sel bakteri dan optimal pada fase eksponensial akhir/awal stasioner. Proses ini diatur oleh plasmid dari DNA ekstrakromosomal (Hafsan, 2014). Gen pengkode bakteriosin diperlukan dalam proses biosintesis (Engelke dkk., 1992). Pengaturan gen pengkode tersebut dilakukan oleh satu atau dua operon. Gen-gen tersebut memiliki peran masing-masing, gen pertama berperan dalam mengkode sandi prekursor peptida (prepeptida), gen kedua mengetahui imunitas gen target, gen ketiga mengkode *ABC transporter* (membran transport) agar prepeptida dapat menyeberangi membran secara bersamaan dan gen keempat berperan untuk mengkode protein aksesori yang diperlukan saat sekresi bakteriosin (Nettles & Barefoot, 1993).



Gambar 1. Skema biosintesis bakteriosin

Regulasi biosintesis bakteriosin dilakukan oleh tiga komponen sistem sinyal transduksi, diantaranya meliputi faktor induksi (*induction factor/IF*), histidine protein kinase (HPK) dan regulator respon sitoplasmik (RR) (Cintas dkk., 2001). Peptida prebakteriosin

dan *preinducer* yang diproduksi melalui ribosom akan mengalami pematangan dan disekresikan melalui ABC *transpoter* (Gambar 1). Peptida *inducer* yang telah matang akan berinteraksi dengan reseptornya yaitu histidine protein kinase (HPK), reseptor ini bersifat autofosforilasi pada sisi sitosolik. Selanjutnya, kelompok fosfat akan ditransfer pada regulator respon sitoplasmik (RR) hingga menjadi aktif dan memungkinkan berperan sebagai aktivator transkripsi yang mengikat promotor spesifik gen bakteri (Drider dkk, 2006).

2.4 Klasifikasi Bakteriosin

Bakteriosin memiliki stabilitas panas yang berbeda-beda. Stabilitas panas disebabkan oleh pembentukan struktur globular kecil dan terjadinya kondisi hidrofobik yang kuat, ikatan silang yang stabil, dan kandungan glisin yang tinggi. Bakteriosin dibagi menjadi tiga kelompok berdasarkan struktur primer, berat molekul dan stabilitas panasnya, yaitu (Meutia, 2011):

1. Kelompok lantibiotik yang merupakan bakteriosin kecil, terdiri atas 19-37 asam amino dan bersifat tahan panas, misalnya nisin, lacticin 481, lactocin S dan karnocin U149.
2. Non-lantibiotik berukuran kecil yang merupakan bakteriosin kecil dengan ukuran kurang dari 15.000 Da dan tahan bila dipanaskan pada suhu 100°C selama lebih dari 30 menit sampai dengan 121°C selama 15 menit, misalnya diplococcin, lactocin A, lactocin A, lactocin 27, lactacin B, lactacin F, sakacin A, pediocin PA-1, leucocin A-UAL 187, dan karnobakteriosin.
3. Non-lantibiotik berukuran besar yang memiliki ukuran lebih dari 15.000 Da dan bersifat peka terhadap panas (inaktif pada suhu 60-100°C) selama 10 sampai 15 menit), misalnya helveticin J, acidofilucin J, acidofilucin A, lactacin A dan B serta caseicin 80.

Bakteriosin sangat efektif mencegah beberapa bakteri Gram positif (*Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus faecalis*, *Staphylococcus pyogenes*), bakteri penghasil spora (*spore forming bacteria*), dan food borne pathogens (*L. monocytogenes*, *Listeria denitrificans*, dan *Escherichia coli*) (Ogunbanwo dkk., 2003; Mahapatra dkk., 2005). Menurut

Amato & Sinigaglia (2010), bakteriosin telah dikelompokkan menjadi empat kelas utama yang berbeda:

1. Kelas-I, Lantibiotik ditandai dengan adanya asam amino thioether yang dihasilkan dari modifikasi pascatranslasi.
2. Kelas-II, Bakteriosin mewakili selaput aktif peptida kecil ($<10\text{kD}$) tahan panas yang tidak mengandung lanthionine. Secara umum dibedakan menjadi dua sub-kelas, yaitu sub-kelas IIa *pediocin-like* dan sub-kelas IIb yang mewakili sebagian kompleks yang membutuhkan dua peptida yang berbeda untuk aktivitasnya.
3. Kelas-III, Bakteriosin yang terdiri atas protein besar ($>30\text{kD}$) yang tidak tahan panas.
4. Kelas-IV, Bakteriosin mengandung lipid penting (*essential*) serta gugus karbohidrat selain protein.

2.5 Mekanisme Penghambatan oleh Bakteriosin

Mekanisme penghambatan pertumbuhan mikroba oleh bakteriosin dimulai dari kerusakan dinding sel. Akibatnya pertumbuhan dinding sel menjadi terhambat ataupun mengalami lisis. Bakteriosin mengubah permeabilitas membran sitoplasma yang menyebabkan kebocoran nutrisi di dalam dinding sel. Nisin, sebagai contoh, dapat membentuk saluran yang permeabel terhadap ion dalam membran sitoplasma dan terjadi peningkatan permeabilitas membran yang menyebabkan hilangnya kekuatan membran dan efluks ATP, asam amino dan ion-ion esensial seperti kalium dan magnesium. Akibatnya, denaturasi protein sel dapat terjadi dan dilanjutkan dengan kerusakan sistem metabolisme dalam sel dengan cara menghambat kerja enzim intraseluler (Meutia, 2011).

Aktivitas bakterisidal dari bakteriosin ditunjukkan dengan adanya kontak langsung antara molekul bakteriosin dan membran plasma. Proses ini diketahui dapat mengganggu kestabilan membran sitoplasma sehingga permeabilitas sel berkurang. Adanya ketidakstabilan membran ini memicu terbentuknya lubang/pori pada membran sel melalui gangguan terhadap *proton motive force* (PMF) (Todorov, 2008). Lubang atau pori tersebut dapat menimbulkan kebocoran yang ditandai dengan adanya aktivitas keluar masuknya molekul seluler sehingga mengakibatkan penurunan gradien pH seluler. Jika integritas fungsi sel sitoplasma mengalami gangguan

maka senyawa intrasel akan keluar dari sel dan sel akan mati. Hal ini dikarenakan pada dasarnya membran sitoplasma memiliki sifat selektif permeabel, melakukan pengangkutan aktif dan berperan mengendalikan komponen di dalam sel (Drider dkk., 2006). Beberapa mekanisme penghambatan oleh bakteriosin adalah mendegradasi materi DNA sel, mengganggu proses pembelahan yang spesifik pada 16S rDNA dan menyebabkan kematian sel bakteri karena adanya sintesis peptidoglikan selanjutnya (Bastos dkk., 2010).

2.6 Faktor-Faktor yang Memengaruhi Aktivitas Bakteriosin

Secara umum, aktivitas bakteriosin dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu pH, suhu, enzim, dan pelarut organik (Senbagam dkk., 2013) serta surfaktan (Sunaryanto & Tarwadi, 2015). Faktor pH dijadikan sebagai pertimbangan untuk bahan pengawet makanan terutama bagi bahan pangan yang berasal dari peternakan dengan kondisi pH rendah seperti daging sapi, ham, susu, *butter* maupun keju. Di sisi lain, bakteri patogen dan pembusuk seperti *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus* dapat bertahan hidup pada kondisi pH yang rendah. Apabila bahan pangan cenderung memiliki pH rendah maka diperlukan bahan pengawet yang memiliki sifat stabil pada pH tersebut untuk mencegah tumbuhnya bakteri patogen maupun pembusuk (Usmiati & Marwati, 2007). Beberapa jenis bakteriosin memiliki karakter tahan terhadap asam dan stabil pada suhu yang tinggi. Hal ini penting untuk karakterisasi bakteriosin sebagai pengawet karena banyak pengolahan pangan yang melibatkan suhu tinggi sehingga bahan pengawet makanan yang digunakan juga harus memiliki sifat stabil terhadap suhu tinggi agar aktivitasnya tetap berjalan (Suwayyvia, 2016). Peningkatan aktivitas bakteriosin juga berkaitan dengan adanya interaksi gugus hidrofil maupun lipofil dari bakteriosin dengan sel mikroba uji. Sehingga, kontak antara bakteriosin dengan membran sel bakteri uji menjadi lebih efektif karena adanya surfaktan (Sunaryanto & Tarwadi, 2015). Surfaktan memiliki pengaruh terhadap sistem permeabilitas membran sel dalam cairan sel (Chen & Yanagida, 2006). Surfaktan seperti EDTA mampu bertindak sebagai *Metal Chelating Agent* (MCA) untuk menurunkan stabilitas membran lipopolisakarida pada membran sel (Elayaraja, 2014). Adanya penurunan stabilitas membran tersebut mengakibatkan bakteriosin lebih efektif dalam menghambat

pertumbuhan sel bakteri uji (Altuntas, 2013). Selain itu, beberapa jenis pelarut organik ini dapat dijadikan sebagai pelarut untuk proses ekstraksi senyawa antimikroba dari media kultur maupun sebagai *eluent* untuk langkah purifikasi selanjutnya tanpa resiko inaktif dari senyawa antimikroba tersebut (Hernandez dkk., 2005).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret hingga Agustus 2018, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Persiapan Isolat

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Lactobacillus pentosus* K 50 yang merupakan koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Isolat ini diisolasi dari susu kuda Sumbawa. Isolat dikultur kembali pada media MRS agar miring dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh pada media agar miring diambil sebanyak tiga ose dan diinokulasikan pada media MRS broth sebanyak 30 mL dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C untuk selanjutnya digunakan sebagai kultur starter pada penentuan fase-fase pertumbuhan. Bakteri uji berupa *Escherichia coli* 1423-SL diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya yang ditumbuhkan pada media NA. Persiapan bakteri uji *E. coli* 1423-SL dilakukan dengan cara mengambil tiga ose penuh koloni bakteri dari media agar miring, kemudian diinokulasikan pada media *Nutrient broth* sebanyak 20 mL dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit dan selanjutnya digunakan sebagai bakteri uji pada tahap uji aktivitas antimikroba.

3.3 Fase-fase Pertumbuhan *Lactobacillus pentosus* K 50

Kultur *L. pentosus* K 50 yang telah diinkubasi selama 24 jam sebanyak 10 % diinokulasikan ke dalam 250 mL media MRS *broth*. Kultur diinkubasi pada suhu 37 °C selama 40 jam tanpa agitasi. Kultur diambil setiap tiga jam sekali hingga jam ke-12, empat jam sekali hingga jam ke-24 dan lima jam sekali hingga jam ke-30. Nilai OD diukur pada panjang gelombang 600 nm. Densitas sel (log sel/mL) ditentukan dengan cara mengonversi nilai OD tersebut

dengan persamaan regresi yang dihasilkan dari kurva standar. Produksi *bacteriocin-like inhibitory substance* (BLIS) dilakukan menggunakan metode *agar disc-diffusion* (Braiek dkk., 2017).

3.3.1 Produksi *Bacteriocin-Like Inhibitory Substances* (BLIS)

Kultur isolat yang telah ditumbuhkan pada media MRS cair dipindahkan ke dalam tabung propilen 15 mL. Kultur disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm dengan suhu 4 °C selama 20 menit. Supernatan dipindahkan pada tempat yang baru. Tingkat keasaman (pH) *cell free supernatant* (CFS) diatur dengan penambahan NaOH 1 M hingga pH-nya berkisar antara 6,5–7 (netral). Supernatan disaring menggunakan membran milipore dengan diameter porinya sebesar 0,22 µm. Hasil penyaringan merupakan BLIS yang akan digunakan untuk uji selanjutnya.

3.3.2 Uji Aktivitas Antimikroba *Bacteriocin-Like Inhibitory Substances* (BLIS) terhadap *Escherichia coli* 1423-SL

3.3.2.1 Metode *agar disc-diffusion*

Kultur *E. coli* 1423-SL sebanyak 100 µL dengan konsentrasi 10^6 sel/ml diinokulasikan pada cawan Petri yang berisi media *Nutrient Agar* yang telah memadat, kemudian diratakan menggunakan drigalski. Media yang telah diinokulasikan dengan *E. coli* 1423-SL diinkubasi pada suhu 4 °C selama 60 menit. *Cell free supernatant* sebanyak 60 µL diinokulsikan ke dalam kertas cakram (*paper disc*) steril dengan diameter 6 mm dan ditunggu hingga kering. Selanjutnya, kertas cakram tersebut diletakkan di atas permukaan kultur *E. coli* 1423-SL pada media NA yang sebelumnya telah diinkubasi pada suhu 4 °C, kemudian diinkubasi kembali suhu 37 °C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur. Aktivitas penghambatan dinyatakan dalam AU/mL (*arbitrary units per mL*, persamaan 1) (Avaiyarasi dkk., 2016).

$$\text{Aktivitas penghambatan (AU/mL)} = \frac{L_z - L_s}{V} \dots\dots\dots(1)$$

Lz : Luas zona hambat (mm²)
 Ls : Luas kertas cakram (mm²)
 V : Volume CFS (mL)

3.3.2.2 Metode pengenceran bertingkat

Kultur *E. coli* 1423-SL dengan konsentrasi 10^6 sel/ml ditambahkan CFS (1:1 v/v) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C , kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-6} . Tiga tingkat pengenceran terakhir dibiakkan pada media NA dengan metode *spread plate* pada inkubasi jam ke-0 dan jam ke-24. Selanjutnya, *Total Plate Count* (TPC) dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam (Han dkk., 2017). Tingkat ketahanan hidup sel (*survival rate*) bakteri uji dinyatakan dalam bentuk persentase (%).

$$\text{Survival Rate} = \frac{\log_{10} (N_1)}{\log_{10} (N_0)} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

N_1 = jumlah sel pada jam ke-24

N_0 = jumlah sel pada jam ke-0

3.4 Uji Konfirmasi BLIS

Konfirmasi CFS yang dihasilkan oleh *L. pentosus* K 50 sebagai bakteriosin dilakukan dengan cara uji aktivitas terhadap enzim proteolitik. Enzim yang digunakan yaitu proteinase-K. *Cell free supernatant* sebanyak 1 mL ditambahkan enzim proteinase K sebanyak 1 mg sehingga diperoleh konsentrasi enzim sebesar 1 mg/mL. Suspensi diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C , kemudian pengujian antibakteri dilakukan menggunakan metode pengenceran bertingkat (Sub-bab 3.3.2.2). Tingkat ketahanan hidup sel (*survival rate*) kurang dari 100 % menandakan pertumbuhan *E. coli* 1423-SL terhambat karena adanya senyawa antimikroba sedangkan apabila lebih dari 100 % menandakan bahwa bakteri tersebut tetap tumbuh tanpa dihambat oleh senyawa antimikroba.

3.5 Penentuan Profil Protein

Cell free supernatant sebanyak 250 mL ditambahkan amonium sulfat sebanyak 90,25 g (konsentrasi 60 %) dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dalam kondisi dingin (4°C) selama 24 jam. Setelah inkubasi, sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit dengan suhu 4°C . Supernatan dibuang dan endapan (*pellet*) disuspensikan kembali dengan buffer fosfat 0,2

M (1:1 v/v), kemudian dilakukan dialisis menggunakan kantung selofan (*cut off*: 14 kDa) sambil dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dalam kondisi dingin (4 °C) selama 24 jam. Langkah selanjutnya, uji aktivitas antimikroba yang ditandai tingkat ketahanan hidup sel (*survival rate*) bakteri uji dilakukan menggunakan metode pengenceran bertingkat (Sub-bab 3.3.2.2).

3.5.1 Penentuan konsentrasi protein (metode Bradford)

Pembuatan reagen Bradford dilakukan dengan melarutkan 0,01 g *coomassie brilliant blue* (CBB) G-250 ke dalam 5 ml etanol 95 % (v/v), lalu ditambahkan 10 mL asam fosfat 85 % (v/v). Campuran dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* kemudian disaring menggunakan kertas saring. Larutan disimpan dalam botol gelap pada suhu rendah (4 °C). Stok pereaksi Bradford harus diencerkan menggunakan akuades steril sebanyak tiga kali sebelum digunakan.

Selanjutnya larutan protein standar dibuat menggunakan 0,01 g *bovine serum albumin* (BSA) yang dilarutkan ke dalam 10 mL akuades steril. Larutan tersebut digunakan sebagai stok dengan konsentrasi 1000 ppm, kemudian diencerkan kembali menjadi konsentrasi 100, 80, 60, 40, 20 dan 10 ppm. Pengukuran kadar protein dilakukan dengan menambahkan 0,1 mL seri larutan standar dengan 5 mL reagen Bradford. Larutan dihomogenkan menggunakan *vortex* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit kemudian pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 595 nm. Hasil dari pengukuran kadar protein larutan standar digunakan untuk memperoleh persamaan regresi linear untuk mengonversi kadar protein yang terdapat pada sampel (Bradford, 1976).

3.5.2 Konfirmasi berat molekul bakteriosin dengan SDS-PAGE

Persiapan sampel dilakukan dengan menambahkan buffer *reducing sample buffer* (RSB) ke dalam sampel (1:1). Larutan RSB memiliki komposisi meliputi SDS, betamercaptoethanol, gliserol dan bromophenil biru. Campuran antara protein dan RSB diinkubasi pada suhu 100 °C selama 5 menit.

Separating gel dibuat dari campuran beberapa komponen berikut: 3,125 mL stok akrilamid 30%; 2,75 mL 1 M Tris pH 8,8; akuades sebanyak 1,505 mL; 75 µL SDS 10 %; 80 µL APS 75 % dan 6,25 µL TEMED. Campuran dimasukkan dalam cetakan gel

menggunakan mikropipet sebanyak 5 μ L dan ditunggu hingga memadat. *Stacking gel* dibuat dengan mencampurkan 30 % akrilamid 0,45 mL; 1 M Tris pH 6,8 sebanyak 0,38 mL; akuabides 2,11 mL; 10 % SDS 30 μ L; 10 % APS 30 μ L dan TEMED 5 μ L. Akuades dihilangkan dari *separating* dan *stacking gel* kemudian dimasukkan ke dalam cetakan serta dipasang sisir. Gel ditunggu hingga mengeras lalu sisir diambil, gel dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis. Kontrol yang digunakan yaitu *bovine serum albumin* (BSA) dengan ukuran 66,2 kDa dengan *BluElf Prestained Marker* (5-256 kDa). *Running buffer* dimasukkan dalam *chamber* hingga gel terendam. Sampel protein dan *marker* dimasukkan ke dalam sumuran, masing-masing sebanyak 20 μ L. Elektroda dihubungkan dengan *chamber* dan diatur dengan arus 80 mA selama 60 menit. Gel diwarnai menggunakan komponen berikut: *coomassie brilliant blue* R250 1 g, metanol 450 mL, akuades 450 mL kemudian digoyangkan. Gel dicuci dengan air dan direndam dalam 50 mL *destaining solution* (methanol, asam asetat glasial dan akuades) (Fatchiyah dkk., 2011).

3.6 Uji Ketahanan Bakteriosin terhadap Faktor Fisikokimia

Cell free supernatant sebanyak 70 mL dibagi ke dalam 14 tabung sehingga masing-masing tabung berisi 5 mL CFS. Tingkat keasaman (pH) suspensi pada lima tabung pertama (masing-masing 5 mL), masing-masing diatur pada pH 3,5,7,9, dan 11 menggunakan HCl 4 N dan NaOH 4 N. Suspensi diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C kemudian dinetralkan kembali untuk uji aktivitas antimikrobanya. Tiga tabung lagi (masing-masing 5 mL) dipanaskan masing-masing pada suhu 60 °C selama 30 menit, 100 °C selama 15 menit dan 121 °C selama 15 menit (autoklaf) dan satu tabung diletakkan pada suhu ruang sebagai kontrol. Tiga tabung selanjutnya (masing-masing 5 mL) masing-masing dilarutkan ke dalam pelarut organik yaitu aseton 25 %, etanol 25 % dan metanol 25 % dengan perbandingan 1:1 (v/v). Suspensi diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C kemudian pelarut organik diuapkan menggunakan evaporator selama 15 menit. Tiga tabung terakhir (masing-masing 5 mL) ditambahkan 1 % surfaktan berupa tween 20, tween 80 dan EDTA. Suspensi diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C (Braiek dkk., 2017).

Aktivitas bakteriosin ditentukan dengan pengenceran bertingkat (Sub-bab 3.3.2.2). Seluruh uji ini dilakukan sebanyak tiga kali

ulangan dengan rancangan percobaan rancangan acak lengkap (RAL). Data dianalisis menggunakan *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan tingkat signifikansi $\alpha=0,05$.



BAB IV

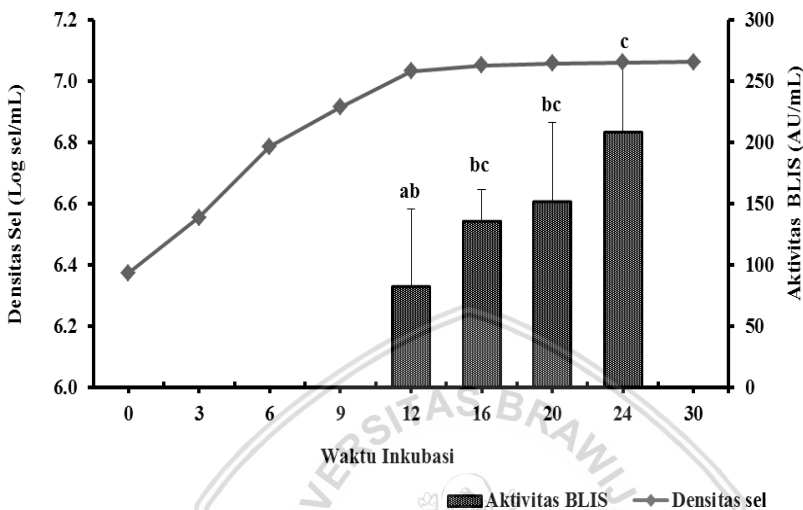
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Aktivitas Antimikroba *Lactobacillus pentosus* K 50

Aktivitas antimikroba *Lactobacillus pentosus* K 50 yang optimum dapat diketahui melalui indeks zona hambat yang dihasilkan selama fase pertumbuhan bakteri penghasil BLIS. Fase-fase pertumbuhan tersebut dapat dilihat pada kurva pertumbuhan berdasarkan data densitas sel setiap waktu sampling (Gambar 2). Fase logaritmik dimulai sejak awal pertumbuhan dan berakhir pada jam ke-24. Pada fase tersebut densitas sel bakteri mengalami peningkatan secara signifikan dari 6,37 log sel/mL hingga mencapai 7,06 log sel/mL. Menurut Srivastava & Srivastava (2003), fase log/pertumbuhan eksponensial merupakan fase terjadinya peningkatan biomassa sel. Fase selanjutnya yaitu fase stasioner yang dimulai pada jam ke-24 sampai jam ke-30. Jumlah sel pada fase ini relatif tetap yaitu 7,06 log sel/mL. Stabilitasnya jumlah sel pada fase ini disebabkan kandungan nutrisi pada media sudah mulai habis dan terjadi penumpukan metabolit sehingga tidak terjadi peningkatan jumlah sel (Srivastava, 2003).

Biomassa sel yang bertambah pada siklus pertumbuhan bakteri menyebabkan komponen biologis dalam sel juga bertambah, termasuk komponen DNA, RNA maupun protein (Braiek dkk., 2017). Protein yang dihasilkan oleh bakteri tersebut salah satunya memiliki sifat bakterisidal terhadap spesies yang berhubungan dekat secara filogeni dan disebut sebagai bakteriosin (Riley & Chavan, 2007). Proses biosintesis bakteriosin terjadi di dalam ribosom selama fase eksponensial dan biosintesis yang optimum terjadi pada fase eksponensial akhir/awal stasioner (Hafsan, 2014). Menurut Ogunbanwo (2003), produksi optimum bakteriosin ditunjukkan oleh adanya aktivitas antimikroba pada fase pertumbuhan eksponensial hingga awal stasioner. Sama halnya dalam penelitian ini, aktivitas antimikroba tertinggi diperoleh pada saat bakteri memasuki akhir fase logaritmik atau awal fase stasioner. Aktivitas antimikroba mulai terdeteksi pada jam ke-12 dan aktivitas tertinggi pada jam ke-24 yaitu sebesar 208,72 AU/mL dengan jumlah densitas sel sebanyak 7,06 log sel/mL (Gambar 2). Meskipun demikian, aktivitas

antimikroba mulai jam ke-16 sampai jam ke-24 tidak ada perbedaan secara nyata ($p>0,05$).

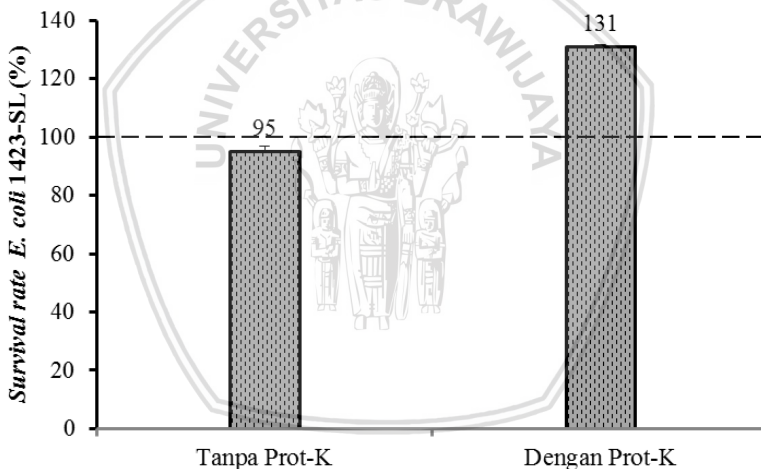


Gambar 1. Kurva pertumbuhan dan aktivitas antimikroba BLIS dari *Lactobacillus pentosus* K 50

4.2 Konfirmasi BLIS

Uji konfirmasi menggunakan enzim proteolitik telah dilakukan untuk mengetahui apakah senyawa metabolit tersebut berupa protein atau bukan. Aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* 1423-SL menjadi hilang dengan ditambahkan protease-K ke dalam *cell free supernatant* (CFS) dengan pH netral. Hal tersebut dapat dilihat dari tingkat ketahanan hidup dari *E.coli* 1423-SL. Tingkat ketahanan hidup *E.coli* 1423-SL yang diberikan CFS tanpa protease-K sebesar $94,91 \pm 1,85$ % sedangkan pada perlakuan menggunakan CFS yang ditambahkan protease-K terjadi pertumbuhan sebesar $130,80 \pm 0,82$ % (Gambar 3). Tingkat ketahanan kurang dari 100% menandakan pertumbuhan *E. coli* 1423-SL terhambat karena adanya senyawa antimikroba sedangkan apabila lebih dari 100% menandakan bahwa bakteri tersebut tetap tumbuh tanpa dihambat oleh senyawa antimikroba. Menurut Braiek dkk (2017), enzim protease-K yang ditambahkan pada CFS mengakibatkan senyawa

antimikrobanya menjadi tidak aktif sehingga tidak dapat lagi menghambat pertumbuhan bakteri uji. Sunaryanto dan Tarwadi (2015) menjelaskan bahwa enzim proteinase-K termasuk dalam golongan enzim proteolitik yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis ikatan-ikatan peptida sehingga berpengaruh terhadap konformasi protein dalam bakteriosin. Apabila protein-protein tersebut mengalami hidrolisis, maka senyawa antimikroba yang dihasilkannya juga akan menjadi tidak aktif dan dapat dikatakan bahwa bakteriosin tersebut sensitif terhadap enzim proteolitik. Berdasarkan penelitian ini, BLIS yang dihasilkan oleh *L. pentosus* K 50 sensitif terhadap enzim proteolitik. Menurut Rajaran dkk (2010), senyawa antimikroba yang sensitif terhadap enzim proteolitik tidak cocok digunakan sebagai pengawet pada buah-buahan. Hal ini dikarenakan beberapa jenis buah-buahan menghasilkan enzim proteolitik seperti papain pada pepaya.



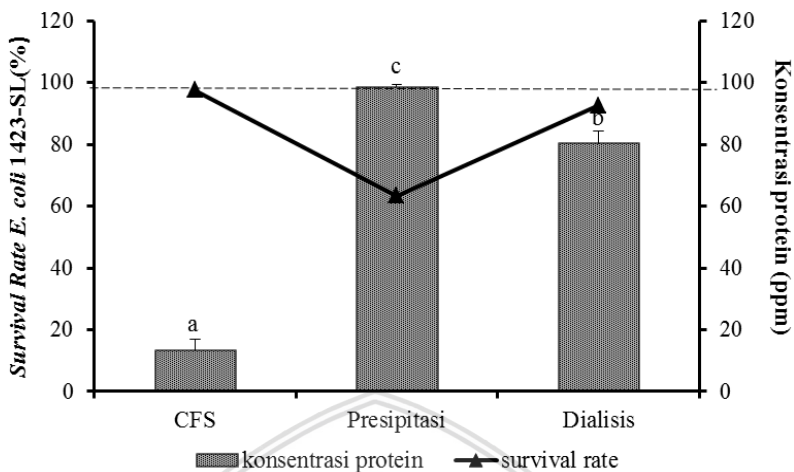
Gambar 2. Ketahanan hidup (*survival rate*) *E. coli* 1423-SL terhadap aktivitas antimikroba BLIS yang dihasilkan *L. pentosus* K 50 sebelum dan setelah penambahan Proteinase-K

4.3 Pemurnian Protein secara Parsial

Pemurnian protein secara parsial dilakukan sebagai tahap awal untuk mengetahui berat molekul protein BLIS dengan metode SDS-PAGE. Pada setiap tahapan pemurnian yaitu sebelum dan sesudah

presipitasi; dan setelah dialisis, konsentrasi protein ditentukan dengan metode Bradford. Adapun aktivitas antimikrobanya ditentukan dengan metode dilusi bertingkat. Konsentrasi protein tertinggi terdapat pada sampel sesudah presipitasi menggunakan amonium sulfat 60%, yaitu sebesar $98,59 \pm 0,67$ ppm ($p < 0,05$) (Gambar 4). Hal ini dikarenakan protein hasil presipitasi tidak hanya berasal dari BLIS saja, melainkan masih ada protein lain dari media tumbuh *L. pentosus* K 50 yaitu MRS broth yang mengandung banyak nutrisi seperti pepton dan yeast extract (Bariyah, 2012). Sedangkan, konsentrasi protein terkecil terdapat pada CFS (sebelum presipitasi) yaitu sebesar $13,27 \pm 3,67$ ppm, yang berbeda nyata dengan konsentrasi protein sesudah presipitasi ($p < 0,05$). Menurut Bhunia dkk (1988), BLIS yang terdapat pada CFS cenderung saling menggumpal satu sama lain maupun dengan protein-protein lain pada media, sehingga konsentrasi protein yang terukur hanya sebagian kecil. Di sisi lain, konsentrasi protein sampel setelah dilakukan dialisis mengalami sedikit penurunan kembali yakni menjadi $80,15 \pm 4,0$ ppm, yang berbeda nyata dengan konsentrasi protein setelah presipitasi dan CFS ($p < 0,05$). Menurut Suwayvia (2016), pada saat proses dialisis ini juga terjadi proses pengenceran dengan penambahan buffer ke dalam presipitat bakteriosin, sehingga terjadi penurunan konsentrasi protein.

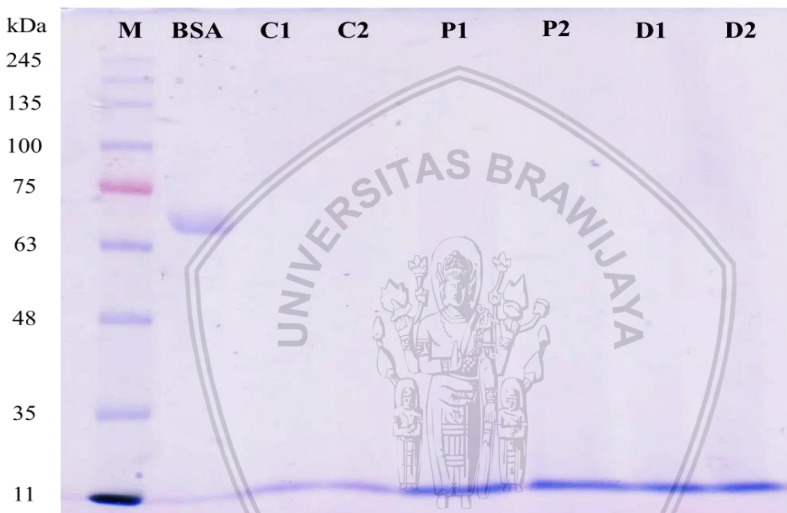
Konsentrasi protein dalam setiap tahapan purifikasi protein secara parsial tersebut berkorelasi dengan tingkat ketahanan hidup bakteri uji (*E. coli* 1423-SL). Korelasi yang terbentuk berupa korelasi negatif, yaitu semakin tinggi konsentrasi protein maka tingkat ketahanan hidup bakteri uji semakin rendah. Namun demikian, nilai signifikansinya lebih dari 5% ($p > 0,05$) yang artinya korelasi tersebut tidak signifikan. Tingkat ketahanan hidup bakteri uji terendah terjadi pada bakteriosin yang dipresipitasi menggunakan amonium sulfat, yaitu sebesar $63,44 \pm 1,48\%$ ($p < 0,05$). Rendahnya tingkat ketahanan hidup bakteri uji tersebut menandakan bahwa terdapat aktivitas antimikroba yang semakin tinggi. Jadi, semakin tinggi konsentrasi protein maka aktivitas antimikrobanya juga semakin tinggi dan tingkat ketahanan hidup *E. coli* 1423-SL semakin rendah.



Gambar 3. Ketahanan hidup (*survival rate*) *E. coli* 1423-SL terhadap aktivitas bakteriosin yang dihasilkan *L. pentosus* K 50 dan konsentrasi protein pada setiap tahapan purifikasi parsial

Penentuan profil protein dengan metode SDS-PAGE yang ditunjukkan melalui terbentuknya pita protein dilakukan untuk mengetahui berat molekul protein hasil purifikasi secara parsial. Hasil elektroforesis dari sampel hasil purifikasi protein (setiap tahapan pemurnian) BLIS yang dihasilkan oleh *L. pentosus* K 50 tidak berhasil mendapatkan pita protein. Hal ini karena adanya kemungkinan membran selofan yang digunakan saat proses dialisis memiliki ukuran pori yang terlalu besar, sehingga protein yang ditargetkan ikut keluar dari membran selama proses dialisis. Namun demikian, hasil elektroforesis sampel CFS (C) berbeda dengan sampel hasil presipitasi (P) dan hasil dialisis (D). Perbedaannya terdapat pada warna gel yang dilalui oleh sampel tersebut. Pada sampel CFS (C), gel terlihat lebih jernih dibandingkan dua sampel yang lain. Sedangkan pada sampel hasil presipitasi (P) dan hasil dialisis (D) terlihat jejak *running* sampel hingga ke bawah. Jejak yang paling terlihat yaitu pada sampel hasil presipitasi (P). Hal ini selaras dengan hasil pengukuran kadar protein yaitu konsentrasi tertinggi terdapat pada sampel hasil presipitasi (Gambar 5). Sehingga, berat molekul protein dari BLIS yang dihasilkan oleh *L. pentosus* K 50 ini diperkirakan kurang dari 11 kDa. Menurut Saraniya &

Jeevaratman (2014), berat molekul bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. pentosus* SJ65 dapat mencapai 39 dan 16 kDa dengan purifikasi menggunakan metode ekstraksi aseton, *cross-linked glucosan chromatography* dan *reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Sedangkan menurut Jiang dkk (2017), *L. pentosus* dapat menghasilkan bakteriosin dengan berat molekul 2,9 kDa menggunakan metode *macroporus resin, gel filtration chromatography* dan *reversed-phase high-performance liquid chromatography*.



Gambar 4. Hasil elektroforesis SDS-PAGE

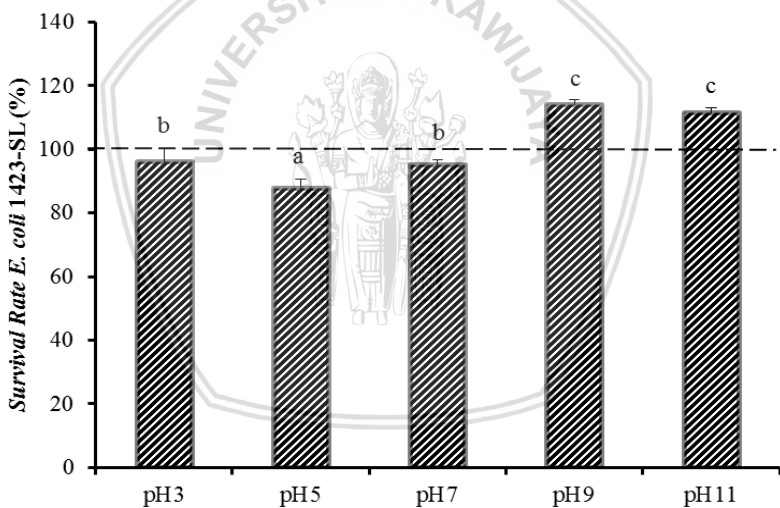
Keterangan: M: *marker*, BSA: *bovine serum albumin* (kontrol), C: *cell free supernatant*, P: hasil presipitasi, D: hasil dialisis.

4.4 Karakterisasi Bakteriosin yang Dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* K 50

4.4.1 Ketahanan bakteriosin terhadap variasi pH

Pada uji ini, aktivitas antimikroba ditunjukkan dengan daya tahan (*survival rate*) dari bakteri yang diujikan, yaitu *E. coli* 1423-SL. Hasil uji ketahanan bakteriosin terhadap beberapa variasi pH (3,5,7,9 dan 11) menunjukkan bahwa CFS pada pH 5 memiliki tingkat

ketahanan tertinggi dibandingkan dengan pada pH yang lain (Gambar 6). Tingkat ketahanan hidup (*survival rate*) bakteri uji paling rendah terdapat pada pH 5 yaitu sebesar $87,68 \pm 2,82\%$ ($p>0,05$). Menurut Usmiati & Marwati (2007), peningkatan produksi bakteriosin berbanding lurus dengan peningkatan pH dan akan mengalami penurunan apabila telah mencapai pH optimum. Aktivitas antimikroba *L. pentosus* K 50 hanya terjadi pada rentang pH 3-7, sedangkan pada pH lebih dari 7 sudah tidak menunjukkan aktivitas antimikroba lagi. Hal tersebut ditandai dengan tingkat ketahanan bakteri uji yang lebih dari 100%. Sehingga bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. pentosus* K 50 ini lebih cocok sebagai bahan pengawet alami pada makanan yang bersifat asam hingga netral, contohnya *salad dressing*, sosis, maupun makanan dalam kaleng (Sunaryanto & Tarwadi, 2015).

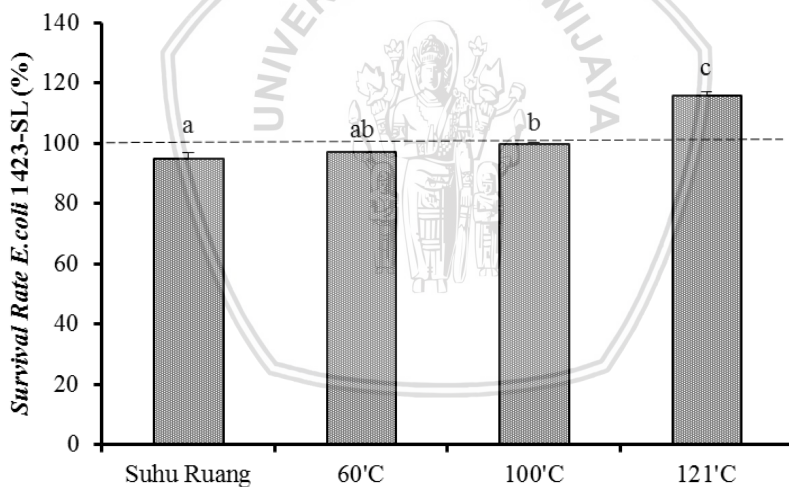


Gambar 5. Ketahanan hidup (*survival rate*) *E. coli* 1423-SL terhadap aktivitas bakteriosin yang dihasilkan *L. pentosus* K 50 pada variasi pH

4.4.2 Ketahanan bakteriosin terhadap beberapa variasi suhu

Hasil uji kestabilan aktivitas antimikroba bakteriosin terhadap suhu menunjukkan bahwa bakteriosin yang dihasilkan oleh isolat *L.*

pentosus K 50 masih stabil hingga suhu 100°C dan tidak ada aktivitas penghambatan lagi pada suhu 121°C (autoklaf). Hal tersebut ditunjukkan dengan tingkat ketahanan hidup bakteri uji yang lebih dari 100% yaitu mencapai $115,61 \pm 1,56\%$ setelah bakteriosin diperlakukan pada suhu 121°C. Aktivitas antimikroba tertinggi terdapat pada CFS yang diberi perlakuan suhu ruang dengan tingkat ketahanan hidup bakteri uji sebesar $94,92 \pm 1,85\%$. Sebagaimana pada uji ketahanan terhadap variasi pH, tingkat ketahanan hidup bakteri uji yang kurang dari 100% menunjukkan adanya aktivitas antimikroba (Gambar 7). Seiring dengan meningkatnya suhu, aktivitas bakteriosin yang dihasilkan *L. pentosus* K 50 semakin berkurang. Menurut Dunder (2006), karakteristik umum dari bakteriosin dapat ditentukan dengan mengetahui resistensinya terhadap suhu. Berbagai macam jenis bakteriosin memiliki tingkat resistensi yang berbeda-beda yaitu pada kisaran 60°C hingga 100°C.



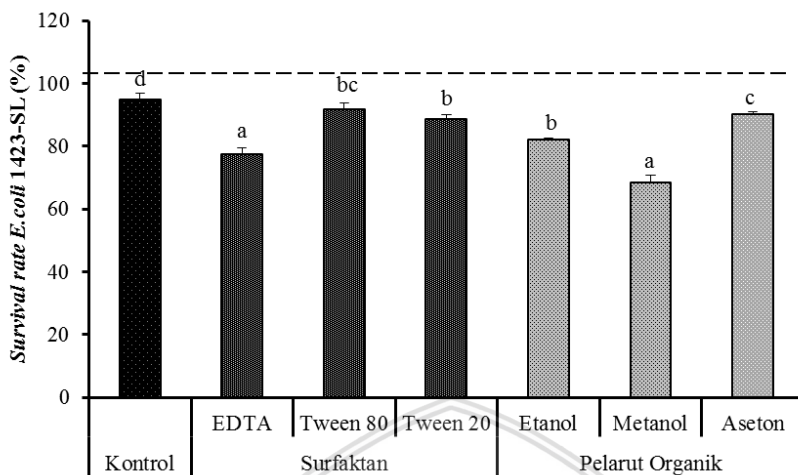
Gambar 6. Ketahanan hidup (*survival rate*) *E. coli* 1423-SL terhadap aktivitas bakteriosin yang dihasilkan *L. pentosus* K 50 pada variasi suhu

Perubahan suhu dapat memengaruhi struktur protein sehingga dapat mengurangi aktivitas biokimianya (Poedjiadi & Supriyanti, 2006). Sebagian besar bakteri asam laktat memproduksi bakteriosin

kelas I dan II. Bakteriosin kelompok kelas ini merupakan protein yang memiliki ikatan hidrofobik dengan struktur tersier yang menyebabkan bakteriosin tersebut stabil pada suhu pemanasan. Kestabilan bakteriosin terhadap pemanasan ini merupakan salah satu parameter penting untuk aplikasi bakteriosin sebagai bahan pengawet alami karena juga banyak makanan yang diproses menggunakan pemanasan (De Vuyst, 1994).

4.4.3 Ketahanan bakteriosin terhadap beberapa jenis surfaktan dan pelarut organik

Aktivitas antimikroba bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. pentosus* K 50 masih terdeteksi (tidak terpengaruh) meskipun diberi perlakuan surfaktan (EDTA, Tween 80 dan Tween 20) dan pelarut organik (etanol, metanol dan aseton) (Gambar 8). Aktivitas bakteriosin mampu menghambat *E.coli* 1423-SL dengan nilai paling tinggi pada perlakuan menggunakan EDTA yang ditunjukkan dengan tingkat ketahanan hidup bakteri uji paling rendah yaitu sebesar $77,64 \pm 1,75\%$ dibandingkan dengan Tween 20 dan Tween 80 ($p < 0,05$). Aktivitas antimikroba bakteriosin mengalami peningkatan saat diberi perlakuan dengan beberapa jenis surfaktan. Peningkatan aktivitas bakteriosin ini berkaitan dengan adanya interaksi gugus hidrofil maupun lipofil dari bakteriosin dengan sel bakteri uji, sehingga, kontak antara bakteriosin dengan membran sel bakteri uji menjadi lebih efektif (Sunaryanto & Tarwadi, 2015). Surfaktan memiliki pengaruh terhadap sistem permeabilitas membran sel (Chen & Yanagida, 2006). Surfaktan (EDTA) memiliki fungsi sebagai *Metal Chelating Agent* (MCA) yang mampu menurunkan stabilitas lapisan lipopolisakarida (LPS) dalam membran sel. Caranya dengan mengikat ion-ion divalensi seperti Mg^{2+} dan Ca^{2+} dan membentuk ikatan kompleks (Elayaraja dkk., 2014). Adanya ketidakstabilan membran ini memicu terbentuknya lubang/pori pada membran sel melalui gangguan terhadap *proton motive force* (PMF) (Todorov, 2008). Lubang atau pori tersebut dapat menimbulkan kebocoran yang ditandai dengan adanya aktivitas keluar masuknya molekul sel sehingga mengakibatkan penurunan gradien pH sel. Jika integritas fungsi sel sitoplasma mengalami gangguan maka senyawa intrasel akan keluar dari sel dan sel akan mati (Drider dkk., 2006).



Gambar 7. Ketahanan hidup (*survival rate*) *E. coli* 1423-SL terhadap aktivitas bakteriosin yang dihasilkan *L. pentosus* K 50 pada beberapa jenis surfaktan dan pelarut organik

Hasil uji kestabilan bakteriosin terhadap pelarut organik menunjukkan bahwa tiga jenis pelarut organik yang ditambahkan pada CFS tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas bakteriosin. Hal ini terlihat dari aktivitas antimikroba dari bakteriosin dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Pelarut organik yang paling efektif yaitu metanol karena dapat menurunkan tingkat ketahanan hidup bakteri uji sebesar $68,46 \pm 2,22\%$ ($p < 0,05$). Menurut Hernandez dkk (2005), beberapa jenis pelarut organik ini dapat dijadikan sebagai pelarut untuk proses ekstraksi senyawa antimikroba dari media kultur maupun sebagai *eluent* untuk langkah purifikasi selanjutnya tanpa resiko inaktif dari senyawa antimikroba tersebut.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Aktivitas penghambatan optimum dari BLIS yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* K 50 terjadi pada fase akhir logaritmik atau awal stasioner (jam ke-24) dengan jumlah densitas sel sebanyak 7,06 log sel/mL dengan aktivitas antimikroba sebesar 208,72 AU/mL.
2. BLIS terbukti memiliki karakter sebagai bakteriosin karena aktivitas BLIS menjadi inaktif setelah ditambahkan enzim proteinase-K. Kadar protein BLIS semakin meningkat setelah dimurnikan secara parsial yang berkorelasi dengan peningkatan aktivitas antimikroba.
3. Aktivitas antimikroba bakteriosin tetap stabil pada kisaran pH 3-7, suhu ruang hingga 100 °C, surfaktan berupa EDTA, Tween 20 dan Tween 80, serta pada pelarut organik berupa metanol, etanol dan aseton.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian ini meliputi :

1. Perlu dilakukan proses presipitasi menggunakan amonium sulfat secara bertingkat agar diperoleh endapan bakteriosin secara optimal.
2. Pada proses dialisis sebaiknya menggunakan kantung selofan dengan ukuran pori yang lebih kecil (<14 kDa) agar protein yang ditargetkan tidak lolos dan protein target dapat terdeteksi saat proses SDS-PAGE.
3. Ukuran marker juga harus disesuaikan dengan kisaran berat molekul protein target serta perlu juga dilakukan penyesuaian konsentrasi akrilamid pada saat pembuatan gel elektroforesis agar pita protein dapat terlihat dengan jelas.
4. Pewarnaan selain menggunakan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) juga perlu dilakukan seperti pewarna silver agar hasil yang didapatkan lebih optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Altuntas, G. 2013. **Bacteriocins: A natural way to combat with pathogens.** In Méndez-Vilas A. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education.** Formatex Research Center. Badajoz. Spanyol.
- Aly, S., Cheik, O.A.T., Imael, B.H., Traore, N., & Alfred, S. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria-A mini review. *African Journal of Biotechnology*. 5(9):678–683.
- Amato, D. D. & Sinigaglia, M. 2010. **Antimicrobial Agents of Microbial Origin: Nisin.** Bentham Science Publisher, Bussum.
- Anacarso, I., Messi, Condò, Iseppi, Bondi, Sabia, de Niederhäusern. 2013. A bacteriocin-like substance produced from *Lactobacillus pentosus* 39 is a natural antagonist for the control of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in fresh salmon fillets. *LWT - Food Science and Technology*. 55:604-611 .
- Avaiyarasi N Devi., A. David Ravindran., Perumal V. & Venkatesan Arul. 2016. In vitro selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control*. 69:124-133.
- Bariyah, Khairul.2012. **Aktivitas antimikrob bakteriosin asal *Lactobacillus plantarum* terhadap berbagai Bakteri patogen selama penyimpanan suhu dingin.** Institut Teknologi Bandung. Skripsi.
- Bastos, M.C.F., Cautinho B.g., & Coelho M.L.V. 2010. Lysostaphin: A Staphylococcal bacteriolysin with potential clinical application. *Pharmaceuticals*. 3:1139-116 1.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C. & Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidolactici*. *Journal of Applied Bacteriology*. 65:261-268.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganisms quantities of protein in utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.

- Braiek, Olfa B., Hamdi G., Paola C., Stefano M., Yannick F., Patrick Le C., Khaled Hani., Omrane Bel H. & Taoufik Ghrairi. 2017. Isolation and characterisation of an enterocin P-producing *Enterococcus lactis* strain from a fresh shrimp (*Penaeus vannamei*). *Journal of Antonie Van Leeuwenhoek*. 110(6):771-786.
- Budde, B.B., Hornbaek T., Jacobsen T., Barkholt V., & Koch A. G. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: Culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiment. *International Journal of Food Microbiology*. 83:171-184.
- Chen, Y.S. & Yanagida, F. 2006. Characteristics and effects of temperature and surfactants on bacteriocin-like inhibitory substance production of soil-isolated *Lactobacillus animalis* C060203. *Current Microbiology*. 53(55):384–387.
- Cintas, L.M., Casaus P., Herrans C., Nes I.F., & Hernandez P.E. 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*. 7(4):281-305.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71:1-20.
- Cotter, P. D., Hill C., Ross R.P. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3:777-788.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E. J., 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, p. 91-142. In **Bacteriocins of lactic acid bacteria** (de Vuyst, L. dan Vandamme, E. J., eds). Blackie Academic dan Professional. Glasgow.
- Drider, D., Fimland G., Hechard Y., McMullen, and Prevost H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70(2): 564–582.
- Dundar, H. 2006. **Characterization and purification of A bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. Cremoris**. Middle East Technical University. Thesis.
- Elayaraja, S., Annamalai, N., Mayavu, P., & Balasubramanian, T. 2014. Production, purification and characterization of

- bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pacific. Journal of Tropical Biomed*, 4(1): 305–311.
- Engelke, G., Gutocchowski-Eckel., Hammelman M., and Entian K. D. 1992. Biosynthesis of lantibiotic nisin: Genomic organization and membrane localization of the NisB protein. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:3730-3743.
- Fatchiyah., Estri Laras A., Sri Wdyarti., & Sri Rahayu. 2011. **Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis**. Erlangga. Jakarta.
- Guerreiro, J., Monteiro V., Ramos C., De Melo Franco B.D.G., Martinez R.C.R., Todorov S.D., & Fernandes P. 2014. *Lactobacillus pentosus* B213 isolated from a Portuguese PDO cheese: Production and partial characterization of its bacteriocin. *Journal of Probiotics and Antimicrobial*. 10:1007-1017.
- Hafsan. 2014. Bakteriosin asal bakteri asam laktat sebagai biopreservatif pangan. *Jurnal Tekno Sains*. 8(2): 1.
- Han, Qi., Baohua Kong., Qian Chen., Fangda Sun & Huan Z. 2017. In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. *Journal of Functional Foods* 32:391–400.
- Hernández, D., E. Cardell, & V. Zárate. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*. 99(1):77–84.
- Izumo, T., Izumi F., Nakagawa I., Kitagawa Y., Shibata H., & Kiso Y. 2011. Influence of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 ingestion on the mucosal immunity of healthy and *Salmonella* Typhimurium-infected mice. *Bioscience Microflora*. 30:27–35. doi: 10.12938/bifidus.30.27.
- Jiang, H., J. Zou., H. Cheng., J. Fang & G. Huang. 2017. Purification, characterization and mode of action of pentocin JL-1, a novel bacteriocin isolated from *Lactobacillus pentosus*, against drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*. 2017(2):7657190.
- Karim, A. 2016. **Uji Potensi Bakteri Asam Laktat dari Susu Kuda Sumbawa (*Equus ferus caballus*) Sebagai Probiotik**.

- Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Skripsi.
- Kotani, Y., Shinkai S., Okamatsu, H., Toba M., Ogawa K., Yoshida H. 2010. Oral intake of *Lactobacillus pentosus* strain b240 accelerates salivary immunoglobulin A secretion in the elderly: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Immunity and Ageing*. 7(11) : 1.
- Leroy, F. & De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science Technology*. 15:67-78.
- Mahapatra, A. K., Muthukumarappan, K., & Julson, J. L. 2005. Applications of Ozone, Bacteriocins, and Irradiation in Food Processing: A Review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 45(1): 447-461.
- Meutia, Yuliasari R. 2011. Bakteriosin : Pengawet Alami Asal Bakteri Asam Laktat, Klasifikasi, Teknik Skrining, dan Purifikasi serta Peluang aplikasinya pada Industri Pangan. *Journal of Agro-Based Industry* 28 (1) : 38-49.
- Navaro, L., Zaraxaga M., Saenz J., Ruiz-Larrea F. & Torres C. 2000. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from rioja red wines. *Journal of Applied Microbiology*. 88:44-51.
- Nettles C. G., & Barefoot S. F. 1993. Biochemical and genetic characterization of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*. 56:338-356.
- Ogunbanwo, H.W. 2003. Influence of cultural condition on the production of bacteriocins by *Lactobacillus brevis*. *African Journal of Biotechnology*. 2(7): 179-184.
- Poedjiadi, A & Suprayanti, T. 2006. **Dasar-dasar Biokimia**. UI Press. Jakarta.
- Rajaran, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B., & Saravnakumar, A. 2010. Purification and characterization of a bacteriosin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Advance Journal. Food Science Technology*. 2(2): 138-144.
- Riley, M. A & Chavan Milind A. 2017. **Bacteriocins: Ecology and Evolution**. Springer. Verlag Berlin Heidelberg.
- Rojo-Bezares, B., Saenz Y., Navarro L., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., and Torres C. 2007. Coculture-inducible bacteriocin

- activity of *Lactobacillus plantarum* strain J232 isolated from grape must. *Food Microbiology*. 24:428-491.
- Salminen, S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., & Brassart D. 1998. Demonstration of safety of probiotics A review. *International Journal Food Microbiology*. 44:93-106. pmid:9849787.
- Saraniya, A. & K. Jeevaratnam. 2014. Purification and mode of action of antilisterial bacteriocins produced by *Lactobacillus pentosus* SJ65 isolated from Uttapam Batter. *Journal of Food Biochemical*. 38(6):612-619.
- Senbagam D., Gurusamy R., & Senthilkumar B. 2013. Physical chemical and biological characterization of a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* NS02. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 6(12): 934-941.
- Settanni, L., & Corsetti, A. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 121:123-138.
- Srivastava, S & P.S. Srivastava. 2003. **Understanding Bacteria**. Kluwer Academic Publisher. New Delhi.
- Stiles, M.E & Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36:1-29.
- Sunaryanto R. & Tarwadi. 2015. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteriosin yang Dihasilkan Oleh *Lactobacillus Lactis* Dari Sedimen Laut. *JPB Kelautan dan Perikanan*. 10(1):11-18.
- Suwayvia, N. 2016. **Produksi bakteriosin asal *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 sebagai antimikroba dan stabilitasnya pada variasi suhu pemanasan, suhu penyimpanan dan pH**. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Skripsi.
- Todorov, S.D. 2008. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39:178-187.

- Usmiati, Sri & T. Marwati. 2007. Seleksi dan Optimasi Proses Produksi Bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. *Jurnal Pascapanen*. 4(1):27-37.
- Woraprayote W., Y. Malila., S. Sorapukdee., A. Swetwiwathana., S. Benjakul., & W. Visessanguan. 2016. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*. 120:118–132.
- Yousef, A.E & Clastrom C. 2003. *Food Microbiology (A Laboratory Manual)*. Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Inc. Ohiosate University. USA .Aly, S., Cheik, O.A.T., Imael, B.H., Traore, N., & Alfred, S. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria-A mini review. *African Journal of Biotechnology*. 5(9): 678–683.

